

EUROPEAN PATENT OFFICE**Patent Abstracts of Japan**

PUBLICATION NUMBER : 2000270855
PUBLICATION DATE : 03-10-00

APPLICATION DATE : 26-03-99
APPLICATION NUMBER : 11083297

APPLICANT : HAYADE KOJI;

INVENTOR : HAYADE KOJI;

INT.CL. : C12N 9/06 C12N 1/14 C12Q 1/26 //(C12N 9/06 , C12R 1:84), (C12N 1/14 , C12R 1:84)

TITLE : FRUCTOSYLVALINE OXIDASE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new enzyme, having specific physical properties, capable of oxidizing fructosylvaline thereby and useful for diagnosis of diabetes mellitus and index, etc., for blood glucose control of diabetes mellitus patients.

SOLUTION: This new enzyme has properties (A) oxidizing fructosylvaline, (B) having about 57 kDA molecular weight, (C) having nearly 40°C optimal temperature and (D) having ≤40°C stable temperature range by heat treatment for 10 min. Furthermore, the new enzyme is preferably obtained by culturing a microorganism (FERM P-17326) having ability to produce fructosylvaline oxidase and fructosylvaline in a sample is preferably determined by using fructosylvaline oxidase and further, a sensor for measuring fructosylvaline and a sensor for measuring HbA1c are preferably prepared by using the fructosylvaline oxidase.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 9/06		C 1 2 N 9/06	B 4 B 0 5 0
1/14		1/14	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/06			
C 1 2 R 1:84)			
審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平11-83297	(71)出願人	596153357 早出 広司 東京都目黒区南 1-13-16
(22)出願日	平成11年 3 月26日(1999.3.26)	(72)発明者	早出 広司 東京都目黒区南 1-13-16
		(74)代理人	100089705 弁理士 社本 一夫 (外5名)
		Fターム(参考)	4B050 CC01 DD04 FF11E LL03 4B063 QA01 QQ80 QR02 QR23 QR66 QS39 QX05 4B065 AA77X CA28 CA46

(54)【発明の名称】 フルクトシルバリン酸化酵素

(57)【要約】

【課題】 本発明は、フルクトシルバリンと反応しうる新規酵素、ならびに本発明の酵素を用いたフルクトシルバリン計測用センサーを提供することを目的とする。

【解決手段】 ピキア属に属する微生物により産生される、以下の性質を有する新規酵素：

- (1) フルクトシルバリンを酸化する；
- (2) 分子量約57kDa；
- (3) 至適温度40℃付近；
- (4) 安定温度範囲40℃以下（10分間加熱処理）。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の性質を有する新規酵素：

- (1) フルクトシルバリンを酸化する；
- (2) 分子量約57kDa；
- (3) 至適温度40℃付近；
- (4) 安定温度範囲40℃以下（10分間加熱処理）。

【請求項2】 ピキア属に属し、フルクトシルバリン酸化酵素の産生能を有する微生物。

【請求項3】 請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を製造する方法であって、ピキア属に属する微生物を培養し、該培養物から酵素を採取することを特徴とする方法。

【請求項4】 フルクトシルバリンをアッセイする方法であって、請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を用いて試料中のフルクトシルバリンを定量することを含む方法。

【請求項5】 HbA1cをアッセイする方法であって、試料中のHbA1cを分解してフルクトシルバリンを生成し、前記フルクトシルバリンを請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を用いて定量することを含む方法。

【請求項6】 請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を含むフルクトシルバリンアッセイキット。

【請求項7】 請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を含むHbA1cアッセイキット。

【請求項8】 請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルバリン計測用センサー。

【請求項9】 請求項1記載のフルクトシルバリン酸化酵素を用いることを特徴とする、HbA1c計測用センサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なフルクトシルバリン酸化酵素に関する。より詳細には、本発明は新規微生物の産生するフルクトシルバリン酸化酵素、ならびにこれを用いたフルクトシルバリン計測用センサーに関する。

【0002】

【従来の技術】蛋白質主鎖および側鎖のアミノ基はグルコースなどの還元糖の還元末端と非酵素的に結合して、アマドリ化合物すなわち糖化蛋白質を生ずる。血中においては、ヘモグロビンが糖化されて糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン；HbA1c）を生ずることが知られている。糖尿病患者では健常人に比べてヘモグロビンに対するHbA1cの存在比率が高いこと、およびHbA1cの血中濃度は過去数週間の血糖値を反映することから、HbA1c血中濃度は糖尿病の診断および糖尿病患者の血糖コントロールの指標として、臨床試験において極めて重要である。

【0003】HbA1cにおいては、ヘモグロビンβ鎖のN末端のバリンにグルコースが結合していることから、フルクトシルバリンをHbA1cの低分子モデル化合物として用いることができる。すなわち、フルクトシルバリンに対して特異性を有する酵素を用いて、HbA1cをアッセイすることが可能である。

【0004】これまでに、種々の菌株からアマドリ化合物に対して作用する酵素が単離されており、これらの酵素を用いてグリコアルブミン、HbA1cおよびフルクトサミン等の糖化蛋白質を分析しうることが示唆されている（特開昭61-268178、特開昭61-280297、特開平3-155780、特開平5-192193、特開平7-289253、特開平8-154672、Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110, 1989、Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338, 1991、J. Biol. Chem., 269(44), 27297-27302, 1994、Appl. Environ. Microbiol., 61(12), 4487-4489, 1995、Biosci. Biotech. Biochem., 59(3), 487-491, 1995、J. Biol. Chem., 270(1), 218-224, 1995、J. Biol. Chem., 271(51), 32803-32809, 1996、J. Biol. Chem., 272(6), 3437-3443, 1997）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フルクトシルバリンと反応しうる新規酵素、ならびに本発明の酵素を用いたフルクトシルバリン計測用センサーを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、フルクトシルバリンを資化しうる微生物をスクリーニングした結果、フルクトシルバリン酸化酵素を産生する新規微生物を単離することに成功して本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は以下の性質を有する新規酵素：

- (1) フルクトシルバリンを酸化する；
- (2) 分子量約57kDa；
- (3) 至適温度40℃付近；
- (4) 安定温度範囲40℃以下（10分間加熱処理）

を提供する。本発明はまた、ピキア（*Pichia*）属に属し、フルクトシルバリン酸化酵素の産生能を有する微生物、ならびに該微生物を培養し、該培養物から酵素を採取することを特徴とする、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素を製造する方法を提供する。

【0008】本発明はさらに、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素を用いてフルクトシルバリンおよびHbA1cをアッセイする方法、アッセイキット、ならびにフルクトシルバリン計測用センサーおよびHbA1c計測用センサーを提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】新規微生物

Pichia sp. N1-1株は、本発明者により海

洋試料から新たに単離された菌株であり、その菌学的特徴は以下のとおりである。

【0010】YM液体培地表面に静置培養において皮膜を形成する。顕微鏡下での観察によれば、細胞形態は楕円形である。ガラススライド培養において嫌気状態に置かれた細胞は、*Mycocandida*型の偽菌糸を形成する。DBBによるコロニー染色において呈色が認められなかったことから、同株は子う菌酵母あるいは子う系不完全酵母に属する。ブリリアントグリーン/サフラニンによる染色の結果、細胞内外に孢子の存在が確認されるが、子うの存在については確認できない。D-グルコース、D-ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、ラフィノースの6種の糖のいずれにおいても発酵は行わない。D-グルコース、D-ガラクトース、さらにやや遅れてラクトース、ラフィノースに対する酸化的な代謝を行う。硝酸塩の資化性を持たない。

【0011】以上の性質から、「酵母の分類同定法」（飯塚広、後藤昭二著、第3版、東京大学出版会、1980年）にしたがって、本菌株は*Pichia*属に属する菌株であると同定された。本菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、寄託番号FERM P-17326として寄託されている。

フルクトシルバリン酸化酵素

本発明の新規フルクトシルバリン酸化酵素は、次の性質を有する：

(1) 作用

酸素の存在下にフルクトシルバリンを酸化して、対応する α ケトアルデヒドおよびアミノ酸、および過酸化水素を生成する。

(2) 分子量

ゲル濾過およびSDS-PAGEのいずれによっても、分子量約57kDaであることが示された。したがって、本酵素はシングルペプチド酵素であることがわかる。

(3) 至適温度

本酵素の温度特性を図1に示す。活性の測定は実施例3に記載の方法により行った。本酵素は40℃付近に至適温度を有する。

(4) 安定温度範囲

本酵素を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で、各温度で10分間加熱処理した後、残存活性を測定した。結果を図2に示す。本酵素は40℃以下の温度範囲で安定である。

【0012】これまでにピキア属からのフルクトシルアミン酸化酵素の報告はない。また、分子量57kDaのサブユニットから構成されている同種の酵素の存在も知られていない。したがって本酵素は新規酵素である。

酵素活性の測定

フルクトシルバリン酸化酵素活性は、酵素反応により消

費される酸素の量または発生する過酸化水素の量を定量することにより測定することができる。当該技術分野においては、酸素および過酸化水素を定量する種々の方法が知られている。例えば、恒温セルに本発明のフルクトシルバリン酸化酵素およびメディエーターを含む緩衝液を入れて一定温度に維持し、ここにフルクトシルバリンを含む試料を加え、酸化還元色素の呈色反応をモニターすることにより、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素の活性を測定することができる。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。あるいは、ペルオキシダーゼを用いて発生する過酸化水素を定量することができる。このような測定系としては、ペルオキシダーゼ〜4-アミノアンチピリン系が知られており、種々の実験書(例えば生物工学実験書 社団法人生物工学会編、培風館平成4年)に記載されている。

酵素の製造方法

本酵素の製造において用いられる微生物は、フルクトシルバリン酸化酵素を産生する微生物であればいずれでもよい。その具体例としては、*Pichia* sp. N1-1株(FERM P-17326)が挙げられる。微生物をフルクトシルバリンを含む適当な天然または合成培地で培養する。フルクトシルバリンを唯一の窒素源とする培地を用いて、フルクトシルバリン酸化酵素を誘導することにより、酵素の収率を高めることが好ましい。フルクトシルバリンを唯一の窒素源とする培地としては、最少培地(例えばM9S)にフルクトシルバリンを添加したものが挙げられる。培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、フルクトシルバリン酸化酵素を含む水溶性画分を得ることができる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素を調製する。

アッセイキット

別の観点においては、本発明は、本発明の新規フルクトシルバリン酸化酵素を含むフルクトシルバリンアッセイキットを特徴とする。本発明のフルクトシルバリンアッセイキットは、本発明に従うフルクトシルバリン酸化酵素を少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の酵素に加えて、アッセイに必要な緩衝液、適当なメディエーター、および必要な場合にはペルオキシダーゼ等の酵素、キャリブレーションカーブ作製のためのフルクトシルバリンもしくはその誘導体の標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従うフルクトシルバリン酸化酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0013】さらに別の観点においては、本発明はHbA1cアッセイキットを特徴とする。HbA1cを酵素的または化学的に分解することによりフルクトシルバリンが生成し、これを本発明のフルクトシルバリン酸化酵素を用いて定量することによりHbA1cをアッセイすることができる。したがって、本発明のHbA1cアッセイキットは、上述のフルクトシルバリンアッセイキットにさらに加水分解試薬または蛋白質分解酵素を含む。酵素センサー

別の観点においては、本発明は、フルクトシルバリン計測用センサーおよびHbA1c計測用センサーを特徴とする。本発明のセンサーを用いて、フルクトシルバリン酸化酵素の作用により消費される酸素または発生する過酸化水素を計測することにより、基質であるフルクトシルバリンの濃度を決定することができる。酸素または過酸化水素を測定する種々のセンサー系が当該技術分野において知られている。電極としては、酸素電極、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。

【0014】酸素電極を用いる場合には、電極表面に本発明の酵素を固定化して、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。ここに試料を加えて電流の減少値を測定する。図3に、本発明の酵素と酸素電極を組み合わせたセンサー系の概略図を示す。

【0015】カーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する場合には、作用電極として酵素を固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、メディエーターを含む緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。

【0016】さらにカーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する方法として、固定化電子メディエーターを用いる系がある。すなわち、作用電極として酵素およびフェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどの電子メディエーターを吸着あるいは共有結合法により高分子マトリックスに固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。

【0017】いずれの電極を用いる場合にも、標準濃度

のフルクトシルバリン溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のフルクトシルバリン濃度を求めることができる。

【0018】HbA1c計測用センサーとして用いる場合は、上述のフルクトシルバリン計測用センサーに、さらに蛋白質分解酵素（例えばプロテアーゼ）を固定化した膜などを組み合わせて、複合センサーを構築する。このような、複数の酵素の組み合わせによる連続的反応を用いる複合センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えばBiosensors -Fundamental and Applications-Anthony P. F. Turner, Isao Karube and George S. Wilson, Oxford University Press 1987に記載されている。

【0019】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

フルクトシルバリン酸化酵素の精製

Pichia sp. N1-1株は、M9S培地（Na₂HPO₄ 6%, KH₂PO₄ 0.3%, NaCl 3%, MgSO₄ 0.01%, CaCl₂ 0.01%, D-グルコース1%）150mlに、窒素源として終濃度0.52%のフルクトシルバリンを添加した培地で培養した。フルクトシルバリンは、Keil. P (Acta Chemica Scandinavica, B, 39, 191-193, 1985)に記載の方法にしたがって合成した。植菌後60時間の細胞を集菌、フレンチプレスで破碎後、遠心分離（9000g、20分間、2回）により未破碎細胞を除去した。次に超遠心分離（69,800g、90分間、2回）を行い、その上清を回収し、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして調製した水溶性画分を、DEAE-5PWを用いる陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。フルクトシルバリン酸化酵素を含む画分は、NaCl濃度0.33M付近で溶出された（図4）。

実施例2

フルクトシルバリン酸化酵素の分子量の検定

実施例1において得られた精製酵素について、G-3000カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の検定を行なったところ、分子量約57kDaであることが明らかとなった（図5）。さらにこれらの活性画分をSDS-PAGEで解析したところ、やはり約57kDaにバンドが確認された。これらの結果から、N1-1株の生産するフルクトシルバリン酸化酵素は分子量約57kDaのシングルペプチド酵素であることが明らかとなった。

実施例3

酵素活性の測定

フルクトシルバリン酸化酵素活性は、ペルオキシダーゼ～4-アミノアンチピリン系を用いた測定系により測定した。生物学実験書（社団法人生物工学会編、培風館、p. 22、平成4年）に記載されている記述を参考に、2 mM フェノール、1.5 mM 4-アミノアンチピリン、2 U/ml ペルオキシダーゼ存在下で、505 nmの吸光度変化をモニターすることにより、フルクトシルバリン酸化酵素活性を測定した。

実施例4

フルクトシルバリン酸化酵素の温度特性の評価

本酵素の活性の温度依存性を図1に示す。活性の測定は実施例3に記載の方法により行った。本酵素は40℃付近に至適温度を有する。次に、本酵素の熱安定性を調べた。本酵素を10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）中で、30、35、40、42、43および45℃の各温度で10分間加熱処理した後、残存活性を測定した。結果を図2に示す。本酵素は40℃以下の温度範囲で安定であることがわかる。

実施例5

フルクトシルバリン酸化酵素の阻害剤

各種金属イオンおよび阻害剤が本酵素に及ぼす影響を調べた。基質であるフルクトシルバリン10 mMの溶液に、各種金属塩または阻害剤を1 mMとなるように加え、上述のペルオキシダーゼ～アミノアンチピリン法を用いてフルクトシルバリン酸化酵素活性を測定した。値は、阻害剤非存在下における本酵素の活性を100%としたときの比活性で表した。結果を図6に示す。

実施例6

フルクトシルバリン酸化酵素の速度論的評価

ペルオキシダーゼ～4-アミノアンチピリン系を用いた測定系を用いて、フルクトシルバリン酸化酵素活性のフルクトシルバリン濃度依存性について測定した。1.5 mM 4-アミノアンチピリン、2.0 mM フェノール、2 U/ml ペルオキシダーゼの存在下で、室温で1分間反応させた。結果を図7に示す。本酵素のフルクトシルバリンに対するK_m値は約3 mMであった。

実施例7

フルクトシルバリン計測用酵素センサーの構築

Pichia sp. N1-1株由来の粗抽出酵素10

0マイクロリットル（5.7 mg蛋白質/ml）をキムワイプに含浸し、これをDKK社製酸素電極に装着し透析膜によって覆った。作成した酵素電極を30℃に保温した10 ml PBS（pH 7.4）内に挿入した。ここに1 Mのフルクトシルバリン水溶液50マイクロリットルを随時添加し、その時の電流減少値を観測した。得られたキャリブレーションカーブを図8に示す。すなわち、本発明の新規フルクトシルバリン酸化酵素を用いた酵素センサーにより、5 mM～20 mMの範囲でフルクトシルバリンの定量を行うことができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素の温度特性を示す。

【図2】 図2は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素の熱安定性を示す。

【図3】 図3は、本発明のフルクトシルバリン計測用センサーの概略図を示す。

【図4】 図4は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素の、DEAE-5PWを用いる陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を示す。

【図5】 図5は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素の、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の検定を示す。

【図6】 図6は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素に及ぼす各種金属イオンおよび阻害剤の影響を示す。

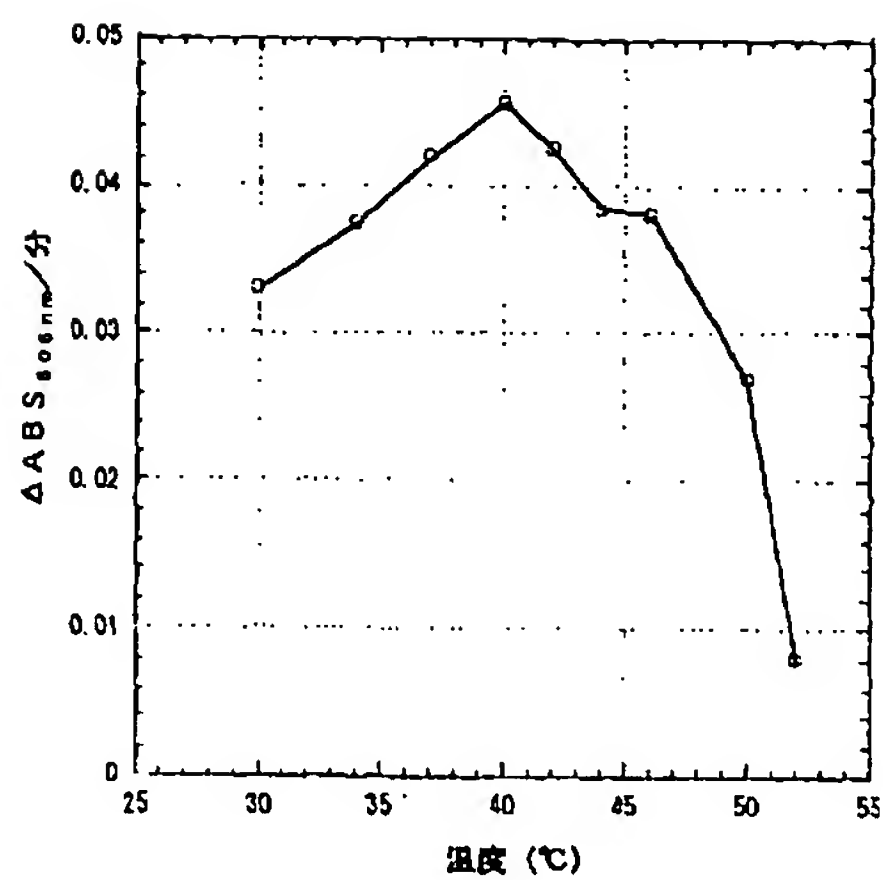
【図7】 図7は、本発明のフルクトシルバリン酸化酵素活性の基質濃度依存性を示す。

【図8】 図8は、本発明のフルクトシルバリン計測用センサーのキャリブレーションカーブを示す。

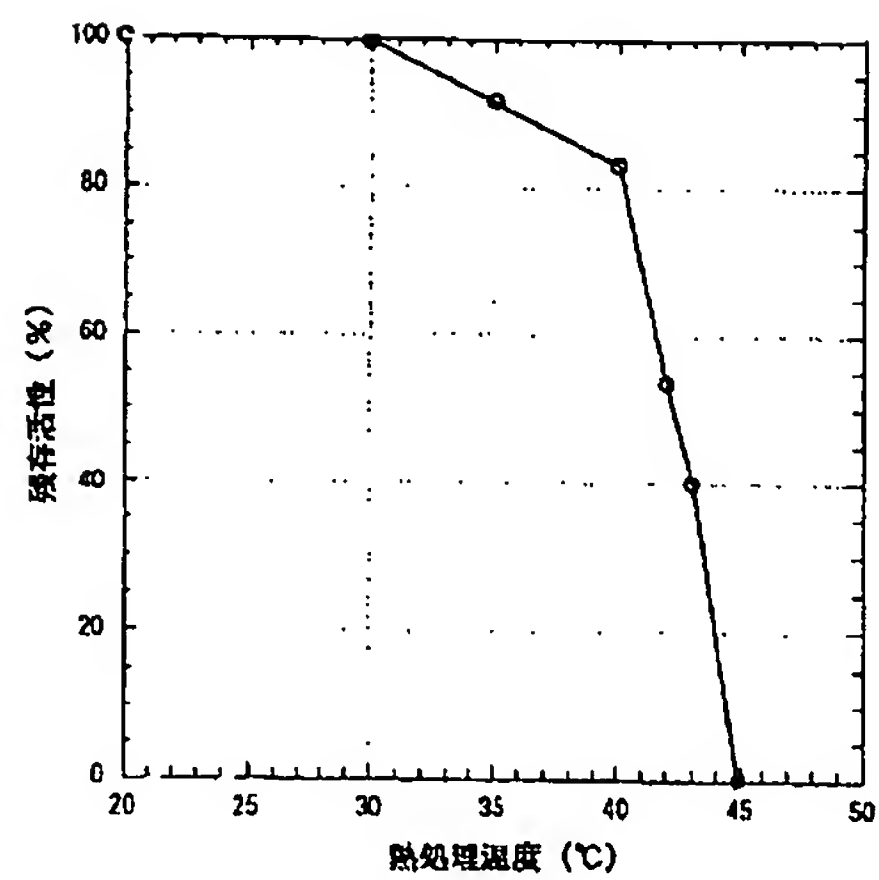
【符号の説明】

1. レコーダ
2. pH-mVメータ
3. I-Vコンバータ
4. 酸素電極
5. 透析膜
6. フルクトシルバリン酸化酵素
7. 恒温槽
8. 攪拌子
9. 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）

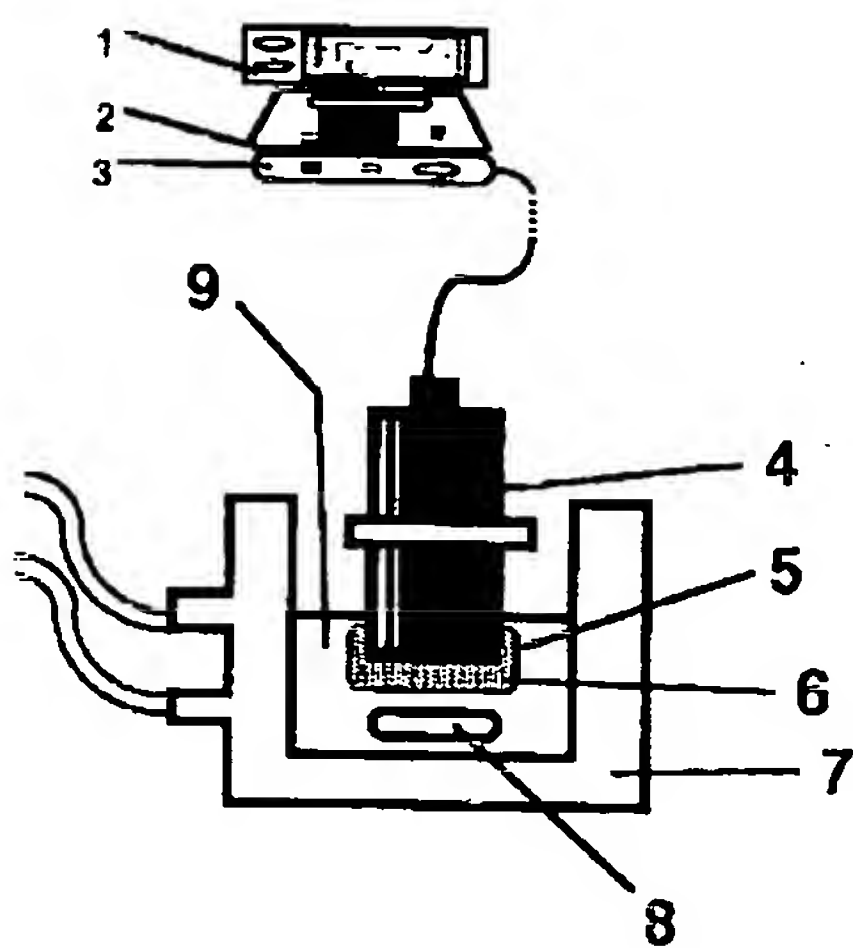
【図1】



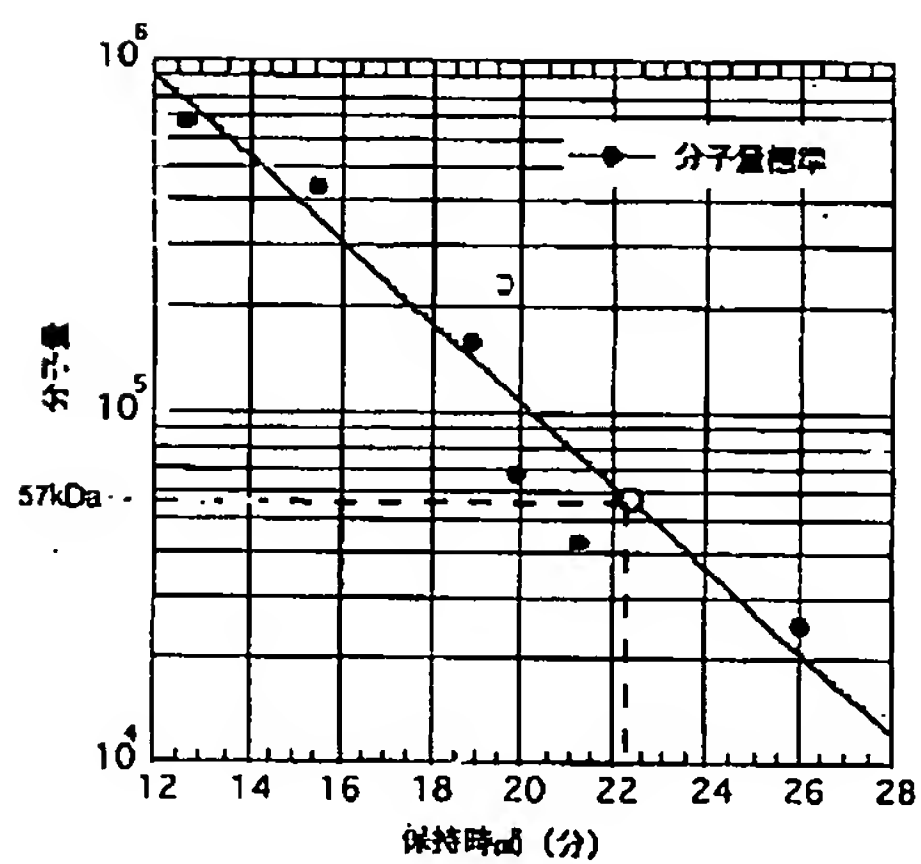
【図2】



【図3】



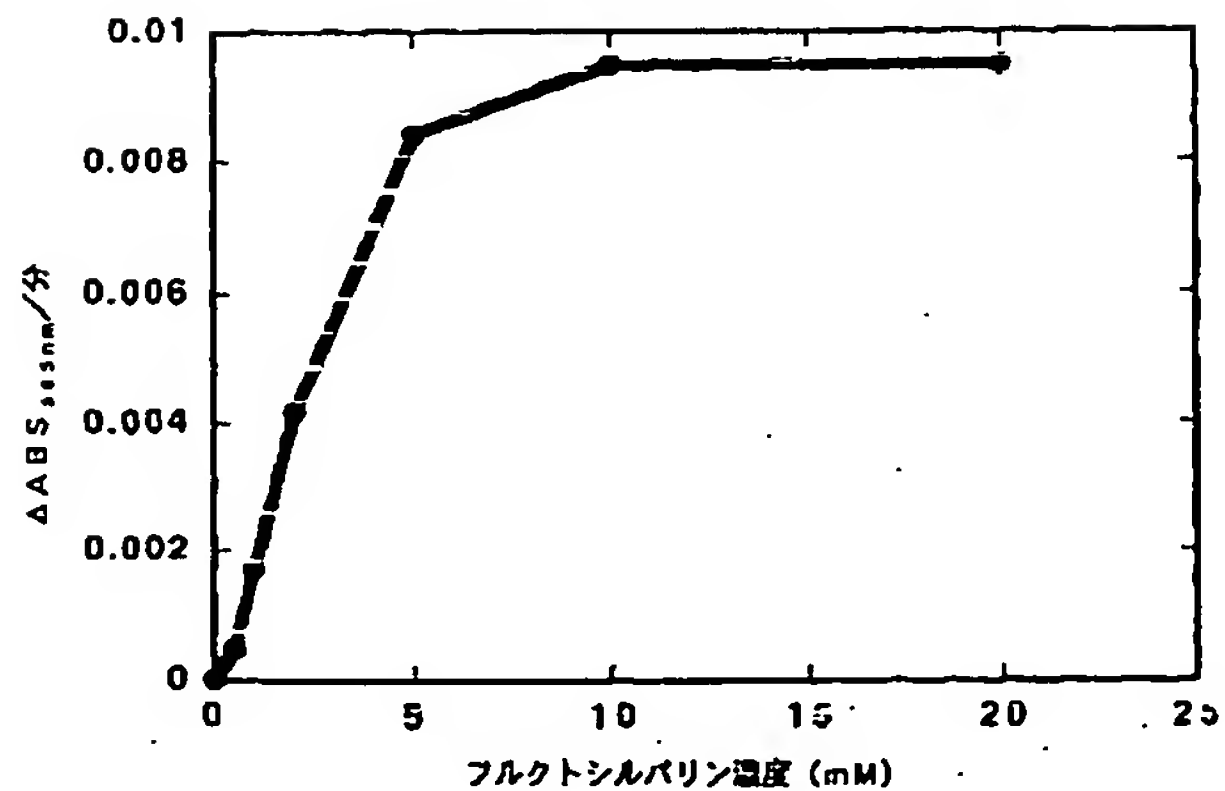
【図5】



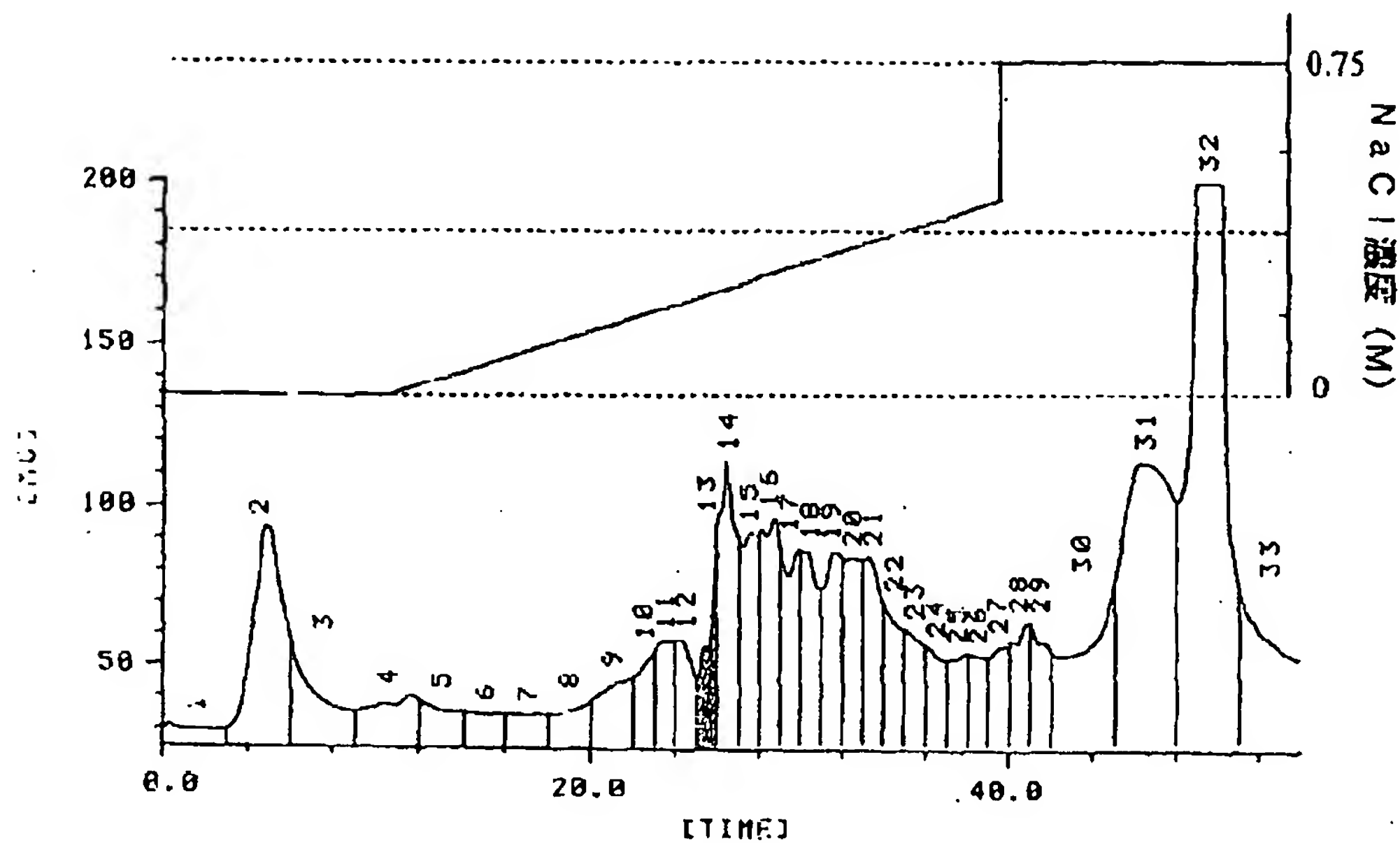
【図6】

阻害剤 (各 1mM)	相対活性 (%)
なし	100
Pb ²⁺	71
Li ⁺	90
K ⁺	103
Na ⁺	108
Mg ²⁺	105
Ca ²⁺	103
Co ²⁺	49
Cu ²⁺	89
Zn ²⁺	61
Ag ³⁺	0
Ba ²⁺	107
Fe ³⁺	61
NaN ₃	103
EDTA	77

【図7】



【図4】



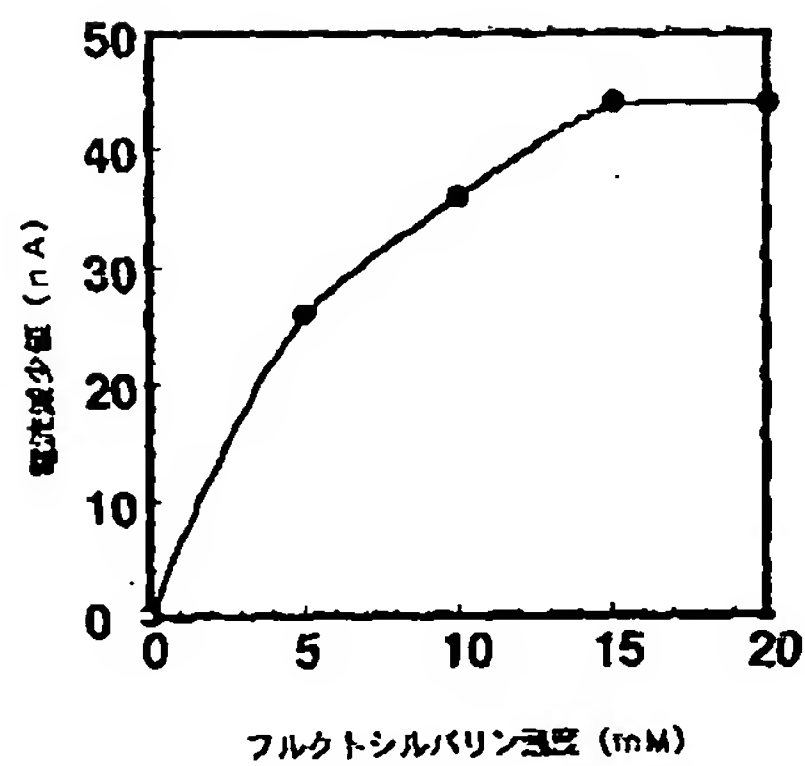
カラム: DEAE-5PW

溶出液A: 10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)

溶出液B: 0.75M NaCl /

10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)

【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

(C12N 1/14

C12R 1:84)

識別記号

FI

(参考)